

15. 3. 2004

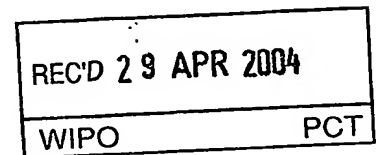
日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 4 月 2 4 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 1 2 0 2 5 3
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 1 2 0 2 5 3]



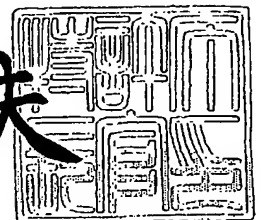
出 願 人 独立行政法人 科学技術振興機構
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 4 月 1 5 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫





【書類名】 特許願

【整理番号】 NP02527-SH

【提出日】 平成15年 4月24日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/48
G01N 33/533
G01N 33/68

【発明の名称】 脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブと
それを用いた脂質セカンドメッ
センジャーの検出 および定量
方法

【請求項の数】 13

【発明者】
【住所又は居所】 東京都新宿区市ヶ谷薬王寺町
4 5 - 1 - 2 0 3

【氏名】 梅澤 喜夫

【発明者】
【住所又は居所】 東京都文京区向丘 2 - 8 - 4 - 7 0 1

【氏名】 佐藤 守俊

【特許出願人】
【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】
【識別番号】 100093230

【弁理士】
【氏名又は名称】 西澤 利夫

【電話番号】 03-5454-7191



【手数料の表示】

【予納台帳番号】 009911

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0013341

【プルーフの要否】 要



【書類名】 明細書

【発明の名称】 脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブとそれを用いた脂質セカンドメッセンジャーの検出および定量方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 脂質セカンドメッセンジャーに特異的に結合するポリペプチドと、該ポリペプチドの両末端に、剛直なリンカー配列を介して連結された異なる蛍光波長を有する二つの発色団と、一方の発色団と剛直なリンカー配列を介して連結された膜局在化配列を有することを特徴とする脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ。

【請求項 2】 脂質セカンドメッセンジャーに特異的に結合するポリペプチドは、脂質セカンドメッセンジャー結合タンパク質である請求項 1 の脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ。

【請求項 3】 脂質セカンドメッセンジャー結合タンパク質は、GRP1 のプレクストリン相同ドメインである請求項 2 の脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ。

【請求項 4】 発色団は、ポリペプチドの N-末端に連結されたシアン蛍光タンパク質と、C-末端に連結された黄色蛍光タンパク質である請求項 1 ないし 3 のいずれかの脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ。

【請求項 5】 リンカー配列は、配列番号 1 の配列の繰り返しからなる剛直な α -ヘリックス状リンカーである請求項 1 ないし 4 のいずれかの脂質セカンドメッセンジャー。

【請求項 6】 少なくとも 1 つのリンカー配列は、ジグリシンモチーフを有する請求項 1 ないし 5 のいずれかの脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ。

【請求項 7】 膜局在化配列は、脂質化配列又は膜貫通配列である請求項 1 ないし 6 のいずれかの脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ。

【請求項 8】 請求項 1 ないし 7 のいずれかの脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを脂質セカンドメッセンジャーと共存させ、蛍光波長の変化を測定することを特徴とする脂質セカンドメッセンジャーの検出および定量方法



。

【請求項 9】 請求項 1 ないし 7 のいずれかの脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを脂質セカンドメッセンジャーと共存させる請求項 8 の脂質セカンドメッセンジャーの検出および定量方法。

【請求項 10】 請求項 1 ないし 7 のいずれかの脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、この動物またはその子孫動物の全細胞において脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブと脂質セカンドメッセンジャーを共存させる請求項 8 の検出および定量方法。

【請求項 11】 脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブは、細胞内で膜に固定化され、該膜において産生される脂質セカンドメッセンジャーを検出・定量する請求項 9 または 10 のいずれかの脂質セカンドメッセンジャーの検出および定量方法。

【請求項 12】 請求項 1 ないし 7 のいずれかの脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって得られる非ヒト動物またはその子孫動物。

【請求項 13】 請求項 12 の非ヒト動物またはその子孫動物に検査試料を導入し、該非ヒト動物またはその子孫動物の細胞における脂質セカンドメッセンジャーを定量する物質のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブに関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、脂質セカンドメッセンジャーが生細胞内のどこで、いつ、産生されたかを定量的に検出するための脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブとそれを用いた脂質セカンドメッセンジャーの検出・定量方法に関するものである。



【0002】

【従来の技術とその課題】

脂質セカンドメッセンジャーの一つであるホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸 (PIP₃) は、細胞膜に存在し、細胞内シグナル伝達において重要な役割を果たしている。具体的には、Akt、PDK1、およびBtk等の結合タンパク質を活性化し、アポトーシス、糖尿病、癌等に関係する様々な細胞機能を調節することが知られている（非特許文献1～3）。PIP₃等の脂質セカンドメッセンジャーは、細胞膜において、ホスファチジルイノシトール-3キナーゼ (PI3K) により触媒されて産生されることが明らかになっており（非特許文献4）、PI3Kが多くの刺激により活性化されることも知られている。しかし、細胞膜のどの部分で、いつ、どのようにしてPIP₃が産生されるのかは明らかになっていない。その大きな原因の一つとして、生細胞におけるPIP₃の空間的および時間的な動態を定量的に分析するための適当な方法がないことが挙げられる。

【0003】

従来、PIP₃の変化は、[³²P] オルトリン酸を用いた細胞の標識により広く測定されてきた。しかし、このような方法では、十分な放射化学的シグナルを得るために数百万個の細胞を粉砕し、分析しなければならないという問題があった。また、最近になって、緑色蛍光タンパク質 (GFP) と、Btk（非特許文献5）、GRP1（非特許文献6）、ARNO（非特許文献7）、またはAkt（非特許文献8）由来のPIP₃結合ドメインとの融合タンパク質が、細胞膜におけるPIP₃蓄積のための指示薬として作用することが報告され、このような指示薬では細胞質ゾルから細胞膜への該融合タンパク質の転位がPIP₃の蓄積を反映するとされている。しかしながら、このような方法では、細胞の形状変化や細胞膜のラフリングなどの影響を受けやすく、PIP₃に無関係な対象に応答しやすいという問題があった。さらに、このような蛍光融合タンパク質では、細胞内のどの膜に融合タンパク質が転位するのかを識別することが困難であるという問題もあった。

【0004】

【非特許文献1】

Cantley, L. C. (2002) Science, 296, 1655-1657.

【非特許文献 2】

Czech, M. P. (2000) Cell, 100, 603-606.

【非特許文献 3】

Vanhaesebroeck, B. and Alessi, D. R. (2000) Biochem. J. , 346, 561-576.

【非特許文献 4】

Wymann, M. P. and Pirola, L. (1998) Biochim. Biophys. Acta, 1436, 127-150.

【非特許文献 5】

Varnai, P., Rother, K. I. and Balla, T. (1999) J. Biol. Chem., 274, 10983-10989.

【非特許文献 6】

Venkateswarlu, K., Gunn-Moore, F., Tavaré, J. M. and Cullen, P. J. (1998) Biochem. J., 335, 139-146.

【非特許文献 7】

Venkateswarlu, K., Oatey, P. B., Tavaré, J. M. and Cullen, P. J. (1998) Curr. Biol., 8, 463-466.

【非特許文献 8】

Watton, J and Downward, J. (1999) Curr. Biol., 433-436.

【非特許文献 9】

Misra, S., Miller, G. J. and Hurley, J. H. (2001) Cell, 107, 559-562.

【非特許文献 10】

Zhang, C., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M. and Hurley, J. H. (1995) Cell, 81, 917-924.

【非特許文献 11】

Miyawaki, A. and Tsien, R. Y. (2000) Method. Enzymol., 327, 472-500.

【非特許文献 12】



Sato, M. , Hida, N., Ozawa, T., and Umezawa, Y. (2000) *Annal. Chem* ., 72, 5918-5924.

【非特許文献 1 3】

Sato, M., Ozawa, T., Inukai, K., Asano, T. and Umezawa, Y. (2002) *Nature Biotechnol.*, 20, 287-294.

【非特許文献 1 4】

Resh, M. D. (1996) *Cell. Signal.*, 8, 403-412.

【非特許文献 1 5】

Merutka, G., Shalongo, W. and Stellwagen, E. (1991) *Biochemistry*, 30, 4245-4248.

【非特許文献 1 6】

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77; 7380-7384, 1980

【非特許文献 1 7】

Current Biology 6(2); 178-182, 1996

【非特許文献 1 8】

Choy, E. et al. (1999) *Cell*, 98, 68-80.

【非特許文献 1 9】

Schlessinger, J. (2000) *Cell*, 103, 211-225.

【非特許文献 2 0】

Venkateswarlu, K., Cunn-Moore, F., Tavaré, J. M. and Cullen, P. J. (1999) *J. Cell Sci.*, 112, 1957-1965.

【非特許文献 2 1】

Vieria, A. V., Lamaze, C. and Schmid, S. L. (1996) *Science*, 274, 2086-2089.

【非特許文献 2 2】

Qualmann, B., Kessels, M. M. and Kelly, R. B. (2000) *J. Cell Biol.*, 150, F111-F116.

【非特許文献 2 3】

Frangioni, J. V., Beaham, P. H., Shifrin, V., Jost, C. A. and Neel



, B. G. (1992) Cell, 68, 545-560.

【非特許文献 24】

Haj, F. G., Verveer, P. J., Squire, A., Neel, B. G. and Bastiaens, P. I. H. (2002) Science, 295, 1708-1711.

【非特許文献 25】

Ceresa, B. C. and Schmid, S. L. (2000) Curr. Opin. Cell Biol., 12, 204-210.

【非特許文献 26】

Lavoie, C. et al. (2002) J. Biol. Chem., 277, 35402-35410.

【0005】

そこで、この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、従来技術の問題点を解消し、PIP₃に代表される脂質セカンドメッセンジャーが生細胞内のどの部位で、いつ、産生されたかを定量的に検出するためのプローブを提供することを課題としている。また、この出願の発明は、このようなプローブを用いて細胞内脂質セカンドメッセンジャーによるシグナリングに影響を与える物質をスクリーニングする方法や疾病に関連したシグナルの測定による診断方法をも提供する。

【0006】

【課題を解決するための手段】

この出願の発明は、以上のとおりの課題を解決するものとして、第1には、脂質セカンドメッセンジャーに特異的に結合するポリペプチドと、該ポリペプチドの両末端に、剛直なリンカー配列を介して連結された異なる蛍光波長を有する二つの発色団と、一方の発色団と剛直なリンカー配列を介して連結された膜局在化配列を有することを特徴とする脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを提要する。

【0007】

この出願の発明は、第2には、脂質セカンドメッセンジャーに特異的に結合するポリペプチドが脂質セカンドメッセンジャー結合タンパク質である脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを、また、第3には、脂質セカンドメッ



センサー結合タンパク質がGRP1のプレクストリン相同ドメインである脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを提供する。

【0008】

さらに、第4には、この出願の発明は、発色団がポリペプチドのN-末端に連結されたシアン蛍光タンパク質と、C-末端に連結された黄色蛍光タンパク質である前記いずれかの脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを提供する。

【0009】

この出願の発明は、第5には、リンカー配列が配列番号1の配列の繰り返しからなる剛直な α -ヘリックス状リンカーである前記いずれかの脂質セカンドメッセンジャーを、第6には、少なくとも1つのリンカー配列がジグリシンモチーフを有する前記いずれかの脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを提供する。

【0010】

また、この出願の発明は、第7には、膜局在化配列が脂質化配列又は膜貫通配列である前記いずれかの脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを提供する。

【0011】

この出願の発明は、さらに、第8には、前記いずれかの脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを脂質セカンドメッセンジャーと共存させ、蛍光波長の変化を測定することを特徴とする脂質セカンドメッセンジャーの検出および定量方法を提供する。

【0012】

この出願の発明は、第9には、前記いずれかの脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを脂質セカンドメッセンジャーと共存させる脂質セカンドメッセンジャーの検出および定量方法を、第10には、前記いずれかの脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって



、この動物またはその子孫動物の全細胞において脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブと脂質セカンドメッセンジャーを共存させる脂質セカンドメッセンジャーの検出および定量方法を提供する。

【0013】

この出願の発明は、さらに、第11には、前記いずれかの脂質セカンドメッセンジャーの検出および定量方法において、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブが細胞内で膜に固定化され、該膜において産生される脂質セカンドメッセンジャーを検出・定量する脂質セカンドメッセンジャーの検出および定量方法をも提供する。

【0014】

この出願の発明は、第12には、前記いずれかの脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって得られる非ヒト動物またはその子孫動物を提供する。

【0015】

そして、この出願の発明は、第13には、前記非ヒト動物またはその子孫動物に検査試料を導入し、該非ヒト動物またはその子孫動物の細胞における脂質セカンドメッセンジャーを定量する物質のスクリーニング方法をも提供する。

【0016】

【発明の実施の形態】

この出願の発明の脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブは、各々異なる機能を有する3つの部位からなるものである。つまり、この脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブは、選択的に脂質セカンドメッセンジャーを認識する脂質セカンドメッセンジャー特異結合部位と、脂質セカンドメッセンジャー特異結合部位の脂質セカンドメッセンジャー認識を光学的に信号発信する発色部位と、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを膜に固定化させるための膜固定化部位からなるものである。

【0017】

図1にこの出願の発明の脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブの



概略模式図を示した。この出願の発明の脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) は、脂質セカンドメッセンジャー (6) と共存したとき、脂質セカンドメッセンジャーと特異的に結合する部位 (以下、脂質セカンドメッセンジャー特異結合部位) (2) が脂質セカンドメッセンジャー (6) と結合し、その際に生じる発色部位 (31、32) の立体配座の変化が、光学的変化 (7a、7b) として現れるという原理によるものであり、この光学的変化 (7a、7b) を測定することにより、脂質セカンドメッセンジャー産生の部位や時間を特定し、定量できるものである。

【0018】

脂質セカンドメッセンジャー特異結合部位 (2) は、例えば、種々の脂質セカンドメッセンジャー結合タンパク質等のポリペプチドである。脂質セカンドメッセンジャー結合タンパク質としては、検出・定量される脂質セカンドメッセンジャー (6) がホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸 (PIP₃) の場合には、GRP1のプレクストリン相同ドメイン (以下PHドメイン) (非特許文献6)、ARNOのPHドメイン、BtkのPHドメイン等が、ホスファチジルイノシトール-3,4-二リン酸 (PI(3,4)P₂) の場合には、TAPPのPHドメイン等が、ホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸 (PI(4,5)P₂) の場合には、PLC δ のPHドメイン等が、ホスファチジルイノシトール-3-リン酸 (PI(3)P) (非特許文献9) の場合には、p40phoxのPXドメインやEEA1-2xのFYVEドメインが、ジアシルグリセロール (非特許文献10) の場合には、PKCのC1ドメイン等が好ましく例示される。

【0019】

もちろん、脂質セカンドメッセンジャー (6) と脂質セカンドメッセンジャー特異結合部位 (2) は、脂質セカンドメッセンジャー (6) と特異的に結合するポリペプチドであれば、これらに限定されず、合成および天然のあらゆるペプチド鎖を用いることができる。

【0020】

この出願の発明の脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) において、分子認識の結果を光学的変化として発信する部位としては、種々の発色団 (31、32) が考慮される。このとき、発色団 (31、32) は、脂質セカンドメッ



センジャー (6) と脂質セカンドメッセンジャー特異結合部位 (2) の結合により生じる脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) の立体構造の変化に応答して精度高く波長変化を生じなければならない。生化学の分野においては、一般的に種々の蛍光発色団が用いられるが、立体構造の変化に敏速に応答するものとしては、蛍光共鳴エネルギー移動 (以下、FRET) (非特許文献 11~13) の生起により色調に変化を来たす発色団がある。

【0021】

したがって、この出願の発明の脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) においては、分子認識の結果を光学的変化として発信する部位として、異なる蛍光波長を有する二つの蛍光発色団 (31、32) を、各々脂質セカンドメッセンジャー特異結合部位 (2) の両末端にそれぞれ連結する。このような蛍光発色団としては、緑色蛍光タンパク質 (GFP) のブルーシフト変異タンパク質であるシアン蛍光タンパク質 (CFP) や、GFPのレッドシフト変異タンパク質である黄色蛍光タンパク質 (YFP) が好ましく選択される。このとき、CFP (31) を脂質セカンドメッセンジャーと特異的に結合するポリペプチドのN-末端に、YFP (32) をC-末端に連結することにより、それぞれドナーおよびアクセプターとして作用し、FRETを生起する。

【0022】

また、脂質セカンドメッセンジャー (6) は、形質膜、内膜等の膜 (8) で産生されることから、この出願の発明の脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) は、末端に脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) を膜に固定化するための膜局在化配列 (5) を有する。このような膜局在化配列 (5) は、いずれか一方の発色団 (32) に連結されており、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) を膜 (8) に固定化させるものである。具体的には、細胞膜に対しては、K-RasやN-Ras等の脂質化配列 (非特許文献 14) や膜貫通配列が例示される。もちろん、検出する脂質セカンドメッセンジャー (6) あるいは固定化させたい膜 (8) に応じて、膜局在化配列 (5) を適宜選択すれば、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) を形質膜や内膜に対してのみならず、核の内膜、あるいはミトコンドリアの外膜等の他の細胞小器



官膜に対しても固定化できる。具体的には、小胞体膜やゴルジ体膜に対しては、N-RasのC181S変異体やN-RasのC181変異体-eNOS、ミトコンドリア膜に対しては、Tom20、カベオラに対しては、caveolin、ラフトに対しては、Cbpが例示される。さらに、その他の核膜やペルオキシソーム膜などのオルガネラ膜上の脂質セカンドメッセンジャー (6) も、それぞれのオルガネラ膜に局在するタンパク質内の局在化配列を導入すれば固定化できる。

【0023】

この出願の発明の脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) が細胞内に導入されると、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) は、細胞膜 (8) に固定化されるが、このとき脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) は二つの発色団 (31、32) が離れた立体配座をとる (A)。しかし、細胞膜 (8) 中で脂質セカンドメッセンジャー (6) が産生されると、脂質セカンドメッセンジャー特異結合部位 (2) がそれを認識し、結合が生じて脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) の立体配座が反転する。これにより二つの発色団 (31、32) が近接してFRETを生起する (B)。

【0024】

このような機構によりFRETが生起し、脂質セカンドメッセンジャー (6) の検出を光学的変化として発信するためには、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) における異なる蛍光波長を有する二つの蛍光発色団 (31、32) は、脂質セカンドメッセンジャー (6) 非共存下では、立体的に離れた位置にあり、脂質セカンドメッセンジャー特異結合部位 (2) と脂質セカンドメッセンジャー (6) の結合により敏速に立体配座が反転する必要がある。そのため、脂質セカンドメッセンジャー特異結合部位 (2) と蛍光発色団 (31、32) は、剛直なリンカー配列 (41、42)、例えばEAAAR (配列番号1) の繰り返し配列からなる剛直な α -ヘリックス状リンカー (非特許文献15) を介して連結していなければならない。

【0025】

さらに、このような剛直なリンカー配列 (41、42) において、少なくとも一つは、蝶番のような働きをする柔軟な部位 (43) を有することが望ましい。これに



より、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) が細胞膜 (8) に固定化された際に、脂質セカンドメッセンジャー (6) 非共存下では、二つの発色団 (31、32) が離れた立体配座をとり、細胞膜 (8) 中で脂質セカンドメッセンジャー (6) が産生され、脂質セカンドメッセンジャー特異結合部位 (2) と脂質セカンドメッセンジャー (6) の結合が生じた際には、立体配座が反転して二つの発色団 (31、32) が近接できるようになる。このように蝶番様の作用を示す柔軟な部位 (43) は、側鎖の小さいアミノ酸数個からなるものであればよく、具体的にはジグリシンモチーフが例示される。

【0026】

また、この出願の発明の脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) において、前記の膜局在化配列 (5) と蛍光発色団 (32) についても、同様の剛直なリンカー配列 (44) を介して結合しているものとする。さらに、膜局在化配列 (5) は、いずれの発色団 (31、32) に連結されていてもよいが、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) が細胞膜 (8) に固定化された際に、好ましい立体配座をとるためには、前記の蝶番様の柔軟な部位 (43) を有するリンカー配列 (42) によって脂質セカンドメッセンジャー特異結合部位 (2) に連結された方の発色団 (32) に連結することが望ましい。

【0027】

以上のとおりのこの出願の発明の脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) は、脂質セカンドメッセンジャー (6) と共存するとき、脂質セカンドメッセンジャー特異結合部位 (2) と脂質セカンドメッセンジャー (6) の結合が起こり、N-およびC-末端のそれぞれの蛍光発色団 (31、32) によるFRETが生起して、蛍光波長の変化が生じるものである。したがって、この蛍光変化を通常行われる種々の化学的あるいは生化学的分析方法を用いて測定することにより、脂質セカンドメッセンジャー (6) を検出することが可能となるのである。また、蛍光強度と脂質セカンドメッセンジャー (6) の量の関係を予め検量することにより、試料における脂質セカンドメッセンジャーを定量することもできるのである。

【0028】



この出願の発明では、以上のとおりの脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) と脂質セカンドメッセンジャー (6) を共存させる方法としては、様々な方法が考えられる。例えば、細胞を破壊して、細胞内から脂質セカンドメッセンジャーを溶出させ、その溶液に脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) を添加して、脂質セカンドメッセンジャー (6) と脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) を共存させる方法があげられる。このような方法で脂質セカンドメッセンジャー (6) と脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) を共存させる場合には、予め脂質を供給してリボソーム膜を形成させ、そのリボソーム膜上に脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) を局在化させることにより、脂質セカンドメッセンジャー (6) を *in vitro* で検出・定量できる。

【0029】

また、この出願の発明では、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) を組み込んだ発現ベクターを個々の培養細胞に導入する方法により、脂質セカンドメッセンジャー (6) と脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) を共存させることができる。発現ベクターとしては、動物細胞発現用のプラスミドベクターが好ましく用いられる。このようなプラスミドベクターを細胞に導入する方法としては、電気穿孔法、リン酸化カルシウム法、リボソーム法、DEAEデキストラン法等の公知の方法を採用することができる。このように、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) を組み込んだ発現ベクターを細胞に導入する方法を用いることにより、脂質セカンドメッセンジャー (6) と脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) が細胞内で共存できる。したがって、細胞を破壊することなく、脂質セカンドメッセンジャー (6) の検出および定量をする *in vivo* 法が可能となる。

【0030】

さらに、この出願の発明の脂質セカンドメッセンジャーの検出および測定方法では、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、この動物またはその子孫動物の全細胞において脂質セカンドメッセンジャー



ー検出・定量用プローブ (1) と脂質セカンドメッセンジャー (6) を共存させることもできる。このとき、細胞内で発現された脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) は、細胞内の任意の膜に固定化され、その膜において産生される脂質セカンドメッセンジャー (6) を検出・定量できるようになる。

【0031】

この出願の発明では、以上のとおりの各種方法により、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、全細胞において脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) と脂質セカンドメッセンジャー (6) が共存しているトランスジェニック非ヒト動物が得られる。トランスジェニック非ヒト動物は、公知の作成法 (例えば、非特許文献 16) に従って作製することができる。このようなトランスジェニック非ヒト動物は、すべての体細胞に脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを保有しているため、例えば、その体内に医薬品や毒物などの検査物質を導入し、細胞および組織における脂質セカンドメッセンジャーの濃度を測定することによって、様々な物質のスクリーニングを行うことができる。

【0032】

以下、添付した図面に沿って実施例を示し、この発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、この発明は以下の例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることは言うまでもない。

【0033】

【実施例】

〔準備〕


(1) 試薬

以下の実施例において、各材料および試薬は次のものを使用した。

【0034】

合成PIP₃、L- α -ホスファチジル-D-myo-イノシトール-3,4,5-三リン酸 (Dcl6) は、和光純薬工業 (日本、大阪市) から購入した。

【0035】



ハムF-12培地、ウシ胎児血清、ハンクス液、およびリポフェクトアミン (LipofectAMINE) 2000試薬は、ライフ・テクノロジーズ (メリーランド州、ロックビル) 製のものを用いた。

【0036】

ダルベッコ変法イーグル培養液およびPDGF-BBは、シグマ・ケミカル社 (ミズーリ州、セントルイス) から購入した。

【0037】

抗GFP抗体はクロンテック (カリフォルニア州、パロアルト) から購入した。

【0038】

Cy5標識抗ウサギIgG抗体は、Jackson ImmunoResearch Lab, Inc. (ペンシルバニア州、ウェストグロブ) から入手した。

【0039】

BONIPY-セラミドC5およびブレフェルジンAは、Molecular Probes Inc. (オレゴン州、ユージーン) から購入した。

【0040】

CFP突然変異は、F64L/S65T/Y66W/N146I/M153T/V163A/N212K、YFP突然変異は、S65G/V68L/Q69K/S72A/T203Yとした。

【0041】

使用された他の化学物質は、すべて分析試薬等級とした。

(2) プラスミド構築

脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブのcDNAを構築するべく、CFP、リンカー配列 (Ln1およびLn2) を有するPHD、リンカー配列 (Ln3) と膜局在化配列 (MLS1) を有するYFP、リンカー配列 (Ln1およびLn2) を有するPHD-R284C (PHDの84番目のRがCに変換されたもの)、リンカー配列 (Ln3) を有するYFP (以下YFP-Ln3)、およびリンカー配列 (Ln3) と膜局在化配列 (MLS2) を有するYFPのフラグメントcDNAは、標準的なPCRにより生成した。

【0042】

各々はpBLuescript SK(+)へサブクローニングされた。クローニング酵素は、すべて宝酒造 (日本、東京都) のものを、製造業者の使用説明書に従って使用し



た。

【0043】

PCRフラグメントは、ABI310ジェネティック・アナライザーにより配列決定した。

【0044】

脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブをコードしている各cDNAは、哺乳類の発現ベクター、pCDNA3.1(+) (Invitrogen Co.、カリフォルニア州、カールズバート) のHind IIIおよびXhoI部位にサブクローニングされた。

<実施例1> 脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブの作成


図1に示されるように、ヒトGRP1 (261-382) 由来のPHDのN-末端にリンカーLn1 (配列番号2) を介して発光オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) 由来の緑色蛍光タンパク質 (GFP) (例えば、非特許文献17) の変異タンパク質である、シアン蛍光タンパク質 (CFP) を、また、C-末端にリンカーLn2 (配列番号3) を介して黄色蛍光タンパク質 (YFP) をそれぞれ遺伝子工学的に連結し、さらに、YFPのC-末端にリンカーLn3 (配列番号4) を介してN-Ras (非特許文献18) のCAAXボックスモチーフを膜局在化配列MLS1 (配列番号5) として連結して、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) (以下、Fllip-pmとする) を作成した。

【0045】

また、この脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (1) において、PHDのアミノ酸配列を全長有するもの (図2a) の他に、同様の方法により、PHDの284番目のアルギニン残基をシステインに変換し、PIP₃と結合しないようにしたもの (以下、Fllip-pmR284Cとする) (図2b)、膜局在化配列MLS1を有さないもの (以下、Fllip-delとする) (図2c)、および膜局在化配列をMLS1からMLS2 (配列番号6) に変換したもの (以下、Fllip-emとする) (図2d) を作製した。

<実施例2> CHO-PDGFR細胞への脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ (CGY) の導入

チャイニーズハムスターの卵巣細胞 (CHO) を10 %ウシ胎児血清 (FCS) を補充



したHamのF-12培養液中、37℃、5 %CO₂下で培養した。得られたCHO-PDGFR細胞をガラス底培養皿に塗布し、LipofectAMINE2000試薬（ライフテクノロジー社製）により37℃、5 %CO₂下で24時間、Fllip-pm、Fllip-pmR284C、Fllip-del、およびFllip-em発現ベクターをそれぞれ遺伝子導入した。

<実施例3> 脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを導入されたCHO-PDGFRのイメージング

(1) Fllip-pm

無血清培養液で血清不足にした後、培養液をHankの平衡塩類溶液で置換した。

【0046】

次に、発明者らによりすでに報告されている方法（例えば、非特許文献12、13）に基づき、室温下で、カール・ツァイス・アクシオバート135顕微鏡上で、MetaFluor（ユニバーサル・イメージング製）（ペンシルベニア州、ウェスト・チェスター）により制御された冷却CCDカメラMicroMAX（ローパー・サイエンティフィック製）（アリゾナ州、ツーソン）を用いて細胞を撮像した。

【0047】

蛍光イメージは480±15 nmおよび535±12.5 nmのフィルターを通した40倍の油浸系対物レンズ（カール・ツァイス製）（ドイツ、イエナ）により検出した。YFPイメージは、共焦点レーザー走査型顕微鏡LSM 510（カール・ツァイス製）により検出された。

【0048】

図3に、CHO細胞におけるFllip-pmの顕微鏡像を示した（aおよびc：垂直方向、b：水平方向）。これよりFllip-pmは、主としてCHO-PDGFR細胞の形質膜に局在化することが確認された。

(2) Fllip-em

次に図4に、CHO細胞におけるFllip-emの顕微鏡像を示した（a：抗GFP抗体によりCy5を染色、b：ゴルジ体マーカーであるBODIPY-セラミドC5で染色、c：小胞体マーカーであるブレフェルジンAで染色、d：a～cの重ね合わせ）。

【0049】

MLS1における181番目のシステインがセリンで置換された変異体を膜局在化配

列として用いたFllip-emでは、蛍光は内膜、すなわち小胞体 (ER) およびゴルジ体に局在していた。

<実施例 4> 脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブの応答性

[Fllip-pm発現CHO細胞における合成PIP₃添加]

実施例 1 で作成された各脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを、脂質セカンドメッセンジャーPIP₃の合成品 (1 μ M) でマイクロインジェクション法により刺激し、デュアルエミッション蛍光顕微鏡で蛍光を測定した。

【0050】

図 5 に、CHO細胞におけるFllip-pmのFRET応答、すなわち、25℃、440 \pm 10 nm で励起させたCFP (480 \pm 15 nm) の発光強度とYFP (535 \pm 12.5 nm) の発光強度の比の経時変化を示した。

図 5 より、Fllip-pmのCFP/YFP発光比は、合成PIP₃ (1 μ l) の添加により急速に減少し、一定値に達することが確認された。これより、CFPからYFPへのFRETが、PIP₃に比例して増大することが示された。したがって、Fllip-pmを用いて形質膜におけるPIP₃の動態を可視化できることが示唆された。

<実施例 5> 脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブの応答性

[Fllip-pm発現CHO-PDGFR細胞におけるPDGF刺激]

次に、生理的刺激により産生されたPIP₃に対するFllip-pmの応答性を調べた。

【0051】

まず、Fllip-pmを、血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR) を安定に発現するCHO-PDGFR細胞に発現させた。血小板由来増殖因子 (PDGF) は、形質膜におけるPDGFRの二量体化を促進し、それによりPDGFRを活性化させ、PDGFRに存在する多数のチロシン残基をリン酸化する。PI3Kは、Src相同2 (SH2) ドメインを介してこれらのチロシルリン酸化部位に漸化され、それにより活性化される (非特許文献 19)。

【0052】

PDGF (50 ng/mL) を形質膜にFllip-pmを発現している明るい細胞に添加した際の、CFP/YFP発光比の経時変化を図 6 および図 7 に示した。

【0053】

図 6 a より、PDGF (50 ng/mL) の添加により、直ちにCFP/YFP発光比が減少し、300秒以内に一定に達することが確認された。

【0054】

一方、PI3Kの特異的阻害剤である、ウォルトマンニン100 nMを用いて同細胞を前処理し、同様にPDGFを添加したところ、PDGF刺激に対するFllip-pmのFRET応答が完全に消失することが確認された (図 6 b)。

【0055】

以上より、Fllip-pmは、形質膜において生理的に産生されたPIP₃のレベルを検出できることが確認された。

<比較例 1> 脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブの応答性

[Fllip-pmR284C発現CHO-PDGFR細胞におけるPDGF刺激]

実施例 4 および 5 と同様の方法により、PHDがPIP₃と結合しないように突然変異されたFllip-pmR284Cの応答性について検討した。

【0056】

PDGF (50 ng/mL) を、形質膜にFllip-pmR284C (図 2 b) を発現した細胞に添加した際の、CFP/YFP発光比の経時変化を図 8 a に示した。

【0057】

公知文献 (非特許文献 20) に記載されるように、Fllip-pmR284Cは、PDGF刺激に対して応答を示さなかった。これより、Fllip-pmのFRET応答は、PHDが膜においてPIP₃を認識したことによることが確認された。

[Fllip-del発現CHO-PDGFR細胞におけるPDGF刺激]

さらに、膜局在化配列 (MLS) が欠失しているFllip-del (図 2 d) を形質膜に発現した細胞に、PDGF (50 ng/mL) を添加した際のCFP/YFP発光比の経時変化を図 8 b に示した。

【0058】

Fllip-delは、PDGF刺激に対し何ら応答を示さなかった。

【0059】

これより、MLSが、脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを細胞膜に固定化させるためだけでなく、膜における脂質セカンドメッセンジャー検出

・定量用プローブの反転型構造変化を生起する上でも重要な役割を果たしていることが示された。

<実施例 6> 脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブの応答性
[Fllip-em発現CHO-PDGFR細胞におけるPDGF刺激]

次に、実施例 3 (2) において、内膜内に局在化されることが確認されたFllip-emを用いて、内膜、すなわち小胞体およびゴルジ体におけるPIP₃動態を可視化した。

【0060】

まず、実施例 2 と同様の方法により、Fllip-emをCHO-PDGFR細胞に発現した。次に実施例 5 と同様の方法により細胞をPDGFで刺激し、CFP/YFP発光比の経時変化を測定した。結果を図 9 および図 10 に示した。

【0061】

Fllip-emの、CFP/YFP発光比はPDGF刺激により直ちには変化しなかった (図 10 a)。一方、形質膜におけるFllip-pmは直ちに応答を示した (図 10 b)。しかし、100~150秒後では、Fllip-emの内膜におけるCFP/YFP発光比は減少し、500秒以内に一定値に達することが確認された (図 3 a)。

【0062】

これより、PDGF刺激により、形質膜のみならず、内膜においてもPIP₃が増加することが示された。また、内膜におけるPIP₃の増加が、形質膜におけるそれよりも2~3倍大きいことが明らかになった。

【0063】

なお、本発明者らは、他のペプチドリガンド、インスリン、および上皮増殖因子を用いた場合にも、同様に形質膜および内膜におけるPIP₃の増加が誘導されることを確認している。

<実施例 7>

そこで、刺激に際する内膜での実質的なPIP₃の増加が形質膜でのそれと、どのような点で異なるのか、その機構を解明することを検討した。

【0064】

内膜におけるPIP₃増加の分子機構を調べるため、リジン 44 がアラニンで置換



されたdynaminのドミナントネガティブな変異体 (DynK44A) (非特許文献 2 1) の、PIP₃増加に対する影響を検討した。

【0065】

Dynaminはグアノシントリホスファターゼ (GTPase) であり、PDGFRを含む受容体チロシンキナーゼのクラスリン介在性エンドサイトーシスを調節する (非特許文献 2 2) が、DynK44AはGTPase活性を欠いており、PDGFRのクラスリン介在性エンドサイトーシスを阻害する。

【0066】

アデノウイルスを介在した遺伝子移入により、CHO-PDGFR細胞においてDynK44Aを発現した後、PDGF (50 ng/mL) により刺激した後、内膜におけるCFP/YFPの経時変化を測定し、図 1 1 に示した。内膜において生起するFRETは、完全に失われていた。一方、形質膜では、DynK44Aの存在下でも、DynK44Aの非存在下と同様にPDGF刺激によりFllip-pmのFRET応答が直ちに観察された (図 1 2) 。

【0067】

以上より、内膜では、DynK44Aの過剰発現により、PDFG刺激によるPIP₃増加が完全に阻害されたのに対し、形質膜においては、影響がなかったことが示された。

【0068】

他のペプチドリガンド、インスリン、および上皮増殖因子による内膜内のPIP₃の増加もまた、DynK44Aの過剰発現によりの過剰発現により阻害されたことから、クラスリン介在性エンドサイトーシスが、内膜における遅延性のPIP₃増加を引き起こすことが明らかになった。

<実施例 8>

そこで、どのようにしてエンドサイトーシスが内膜におけるPIP₃増加を引き起こすのかについて検討した。

【0069】

内膜におけるPIP₃動態を詳細に調べるため、アデノウイルスを介在した遺伝子移入により、タンパク質チロシンホスファターゼ 1 B (PTP1B) をCHO-PDGFR細胞において過剰発現させた。



【0070】

PTP1Bは、主にERの細胞質側の表面上に局在化されることが知られている（非特許文献23）。また、最近になって、PDGFRを含む受容体チロシンキナーゼがリガンドによる刺激を受けた場合、細胞表面で活性化された受容体がエンドサイトーシスにより内部移動した後、ERの細胞質側の表面においてPTP1Bにより脱リン酸化され、不活性化されることが報告されている（非特許文献24）。

【0071】

筆者らは、過剰発現されたPTP1Bが、エンドサイトーシスされたPDGFRを選択的に脱リン酸化すること、および形質膜におけるPDGFRには影響を及ぼすことなく、ERの細胞質側の表面でのPDGFRによるPI3Kの補充および活性化を阻害することを期待した。

【0072】

PTP1BをCHO-PDGFR細胞に過剰発現させ、Fllip-emを用いてPDGF刺激後の内膜におけるCYP/YFP発光強度比の経時変化を測定し、図13に示した。PDGF刺激によるPIP₃の増加は、完全に失われていた。

【0073】

一方、形質膜では、Fllip-pmを用いて検出されたPDGF刺激によるPIP₃の増加は、PTP1Bの過剰発現により影響されなかった（図14）。これは、形質膜にはPTP1Bが存在しないためと考えられる。

【0074】

以上より、PIP₃量の増加は、クラスリン被覆エンドサイトーシス小胞体により、活性化されたPDGFRが内膜に内部移動され、それによりPI3Kが活性化し、PIP₃が内膜で産生されたことによると示唆された。したがって、形質膜において産生されたPIP₃の、エンドサイトーシス小胞体による内膜への流入は無視できる程度であり、むしろ、内膜において観察されるPIP₃は内膜においてin situで産生されていることが示された。

【0075】

【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この発明によって、in vivoにおいても高い精度



で、簡便に、脂質セカンドメッセンジャーを検出・定量することを可能とする脂質セカンドメッセンジャープローブと、それを用いた脂質セカンドメッセンジャーの検出・定量方法が提供される。この発明の脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブは、遺伝的にコードされた蛍光プローブであり、あらゆる脂質セカンドメッセンジャーに対して適応性を示す。

【0076】

したがって、この発明の脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを用いることにより、脂質セカンドメッセンジャーの単一生細胞における動態を可視化できるだけでなく、各種の外的刺激による脂質セカンドメッセンジャーの増加が、形質膜、内膜のいずれにおいて大きいのかや、脂質セカンドメッセンジャーの増加がどのような機構により生じるものなのかについても明らかにできる。

【0077】

受容体エンドサイトーシスは、受容体の活性化を弱める作用だけでなく、下流でのシグナリングを調整する作用も有すると考えられてきた（非特許文献21、25、26）が、これまでは、生細胞のどの部位において、いかにして、いつ、受容体エンドサイトーシスが起こり、シグナル経路が誘発されるのかについては明らかにされていなかった。この出願の発明の脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブは、脂質セカンドメッセンジャー産生の機構、タイミング、および部位に関する広範な知見を得る上で非常に有用性が高いといえる。

【0078】

また、この出願の発明の脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブを用いることにより、今後さらに、例えば、細胞内の異なる膜において産生される同一の脂質セカンドメッセンジャー（例えばPIP₃）が、その結合タンパク質の種類に応じて、異なる下流シグナルを調節し、遺伝子発現、細胞代謝、および細胞骨格の調節等の、個別の細胞機能を最終的に引き出していることなども明らかにされるものと期待される。

【0079】

【配列表】

<110> Japan Science and Technology Corporation



<120> Probe for visualizing lipid second messengers and method of detect
ion and determination of lipid second messengers using the same

<130> NP02527-SH

<160> 6

<210> 1

<211> 5

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Synthesized Oligonucleotide

<400> 1

aaaar

5

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Synthesized Oligonucleotide

<400> 2

aaaar aaaar aaaar aaaar aaaar aaaar

30

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Synthesized Oligonucleotide

<400> 3

aaaar aaaar aaaar ggeaa areaa areaa ar

32

<210> 4



<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Synthesized Oligonucleotide

<400> 4

eaar eaar eaar eaar eaar eaar eaar 35

<210> 5

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Synthesized Oligonucleotide

<400> 5

qgcmg lpcvv m 11

<210> 6

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Synthesized Oligonucleotide

<400> 6

qgsmsg lpcvv m 11

【図面の簡単な説明】

【図 1】

この発明の脂質セカンドメッセンジャー可視化プローブの構成を例示した概略模式図である。

【図 2】

この発明の実施例において、作製された各種の脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブの構成を示した概略模式図である。(a : Fl lip-pm、b : Fl



lip-pmR284C、c : Fllip-del、d : Fllip-em)

【図 3】

この発明の実施例において、CHO細胞に局在化されたFllip-pmの蛍光顕微鏡像を示した図である。(a および c : 垂直方向、b : 水平方向)

【図 4】

この発明の実施例において、CHO細胞に局在化されたFllip-emの共焦点レーザー走査型顕微鏡像を示した図である。(a : 抗GFP抗体によりCy5を染色、b : ゴルジ体マーカーであるBODIPY-セラミドC5で染色、c : 小胞体マーカーであるブレフェルジンAで染色、d : a ~ c の重ね合わせ)

【図 5】

この発明の実施例において、CHO細胞におけるFllip-pmのFRET応答 (25℃、 440 ± 10 nmで励起させたCFP (480 ± 15 nm) 度とYFP (535 ± 12.5 nm) の発光強度の比) の経時変化を示した図である。(矢印：合成PIP₃ (1 μ l) 添加)

【図 6】

この発明の実施例において、Fllip-pm発現CHO-PDGFR細胞にPDGF (50 ng/mL) を添加した際の、CFP/YFP発光比の経時変化を示した図である。(矢印/波線：PDGF (50 ng/mL) 添加、a : PDGF添加、b : Wortmannin処理後PDGF添加)

【図 7】

この発明の実施例において、Fllip-pm発現CHO-PDGFR細胞にPDGF (50 ng/mL) を添加した際の、添加後の経過時間毎の蛍光顕微鏡写真を示した図である。(a : 0秒、b : 100秒、c : 300秒、d : 500秒)

【図 8】

この発明の実施例において、Fllip-pmR284C発現CHO-PDGFR細胞およびFllip-del発現CHO-PDGFR細胞にPDGF (50 ng/mL) を添加した際の、CFP/YFP発光比の経時変化を示した図である。(矢印/波線：PDGF (50 ng/mL) 添加、a : Fllip-pmR284C、b : Fllip-del)

【図 9】

この発明の実施例において、Fllip-em発現CHO-PDGFR細胞にPDGF (50 ng/mL) を添加した際の、添加後の経過時間毎の蛍光顕微鏡写真 (25℃) を示した図であ



る。(a:0秒、b:120秒、c:300秒、d:600秒)

【図10】

この発明の実施例において、Fllip-em発現CHO-PDGFR細胞およびFllip-pm発現CHO-PDGFR細胞にPDGF (50 ng/mL) を添加した際の、CFP/YFP発光比の経時変化を示した図である。(矢印/波線:PDGF (50 ng/mL) 添加、a:Fllip-em、b:Fllip-pm)

【図11】

この発明の実施例において、DynK44A発現CHO-PDGFR細胞をPDGF (50 ng/mL) により刺激した際の、内膜におけるCFP/YFP発光比の経時変化を示した図である。

(矢印/波線:PDGF (50 ng/mL) 添加、a:DynK44A発現なし(小胞体刺激)、b:DynK44A発現(PDGF刺激)、c:DynK44A発現なし(PDGF刺激))

【図12】

この発明の実施例において、DynK44A発現CHO-PDGFR細胞をPDGF (50 ng/mL) により刺激した際の、形質膜におけるCFP/YFP発光比の経時変化を示した図である。(矢印/波線:PDGF (50 ng/mL) 添加、a:DynK44A発現、b:DynK44A発現なし)

【図13】

この発明の実施例において、Fllip-emを用いてPTP1Bを過剰発現させたCHO-PDGFR細胞にPDGFを添加した際の内膜におけるCFP/YFP発光強度比の経時変化を示した図である。(矢印/波線:PDGF (50 ng/mL) 添加、a:PTP1B過剰発現、b:PTP1B過剰発現なし)

【図14】

この発明の実施例において、Fllip-emを用いてPTP1Bを過剰発現させたCHO-PDGFR細胞にPDGFを添加した際の形質膜におけるCFP/YFP発光強度比の経時変化を示した図である。(矢印/波線:PDGF (50 ng/mL) 添加、a:PTP1B過剰発現、b:PTP1B過剰発現なし)

【符号の説明】

A 脂質セカンドメッセンジャー非共存下

B 脂質セカンドメッセンジャー共存下

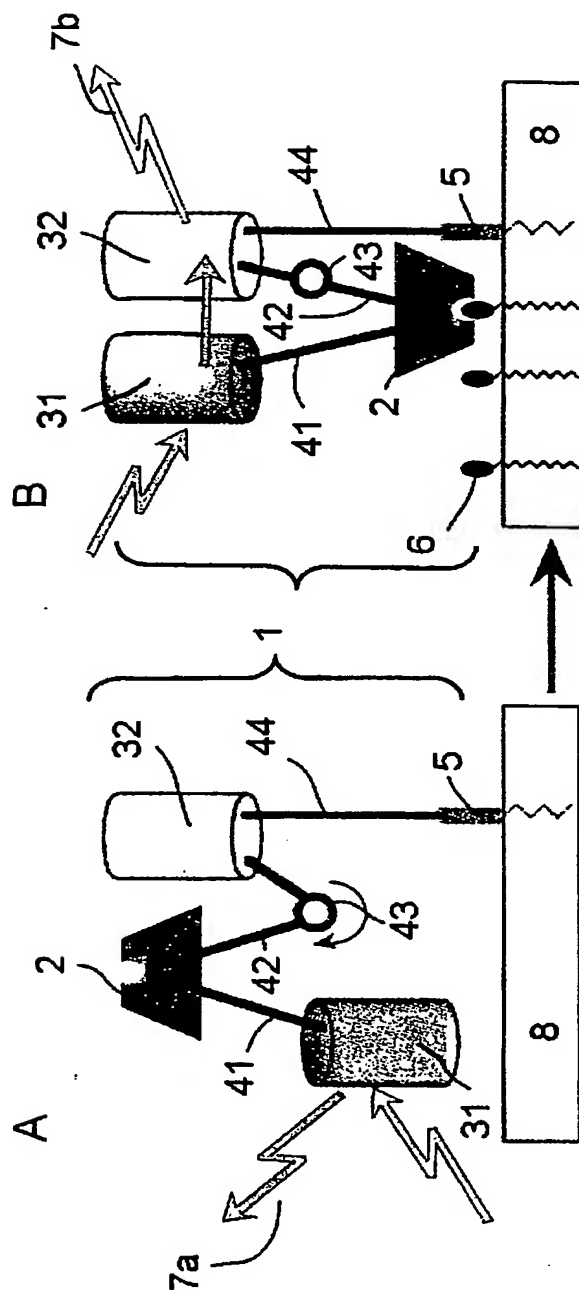


- 1 脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブ
- 2 脂質セカンドメッセンジャー特異結合部位
- 31 発色団 (CFP)
- 32 発色団 (YFP)
- 41 剛直なリンカー配列
- 42 剛直なリンカー配列
- 43 柔軟な部位
- 44 剛直なリンカー配列
- 5 膜局在化配列
- 6 脂質セカンドメッセンジャー
- 7a 脂質セカンドメッセンジャー非共存下の発光
- 7b 脂質セカンドメッセンジャー共存下の発光
- 8 膜

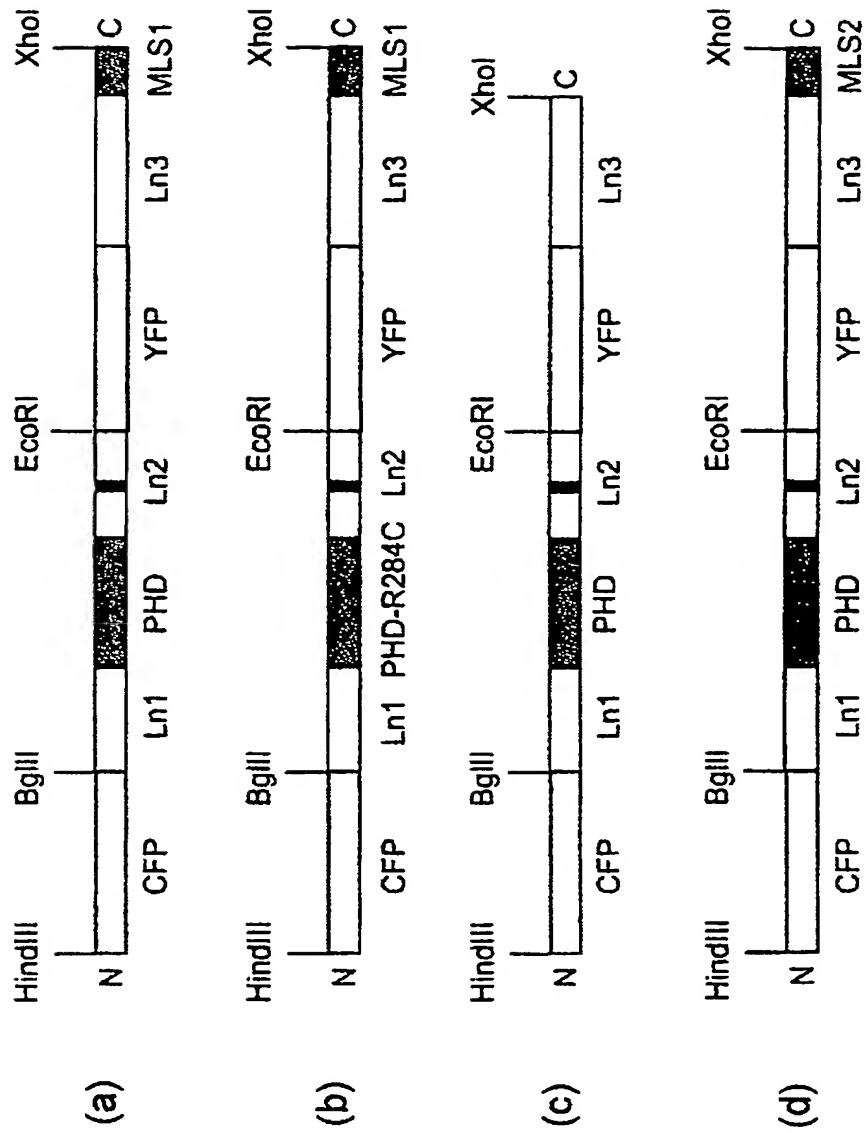
【書類名】

図面

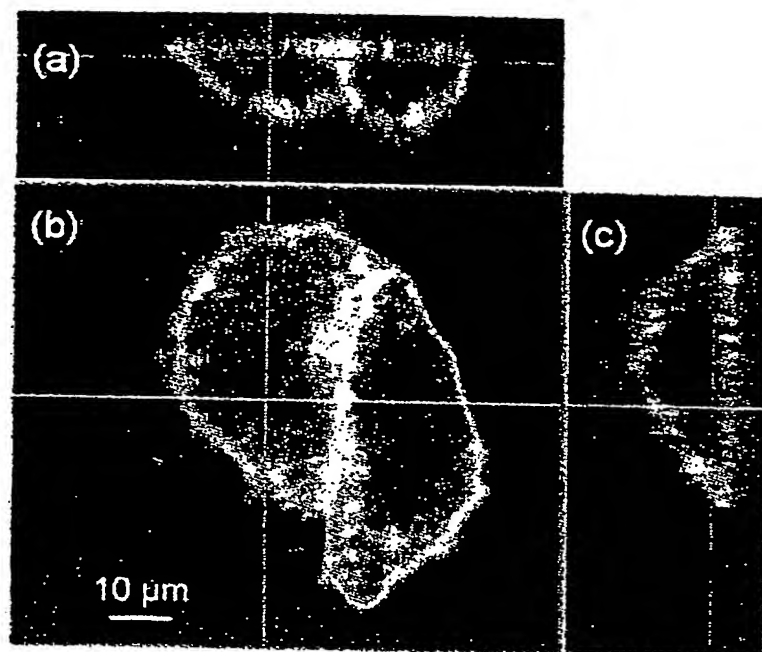
【図 1】



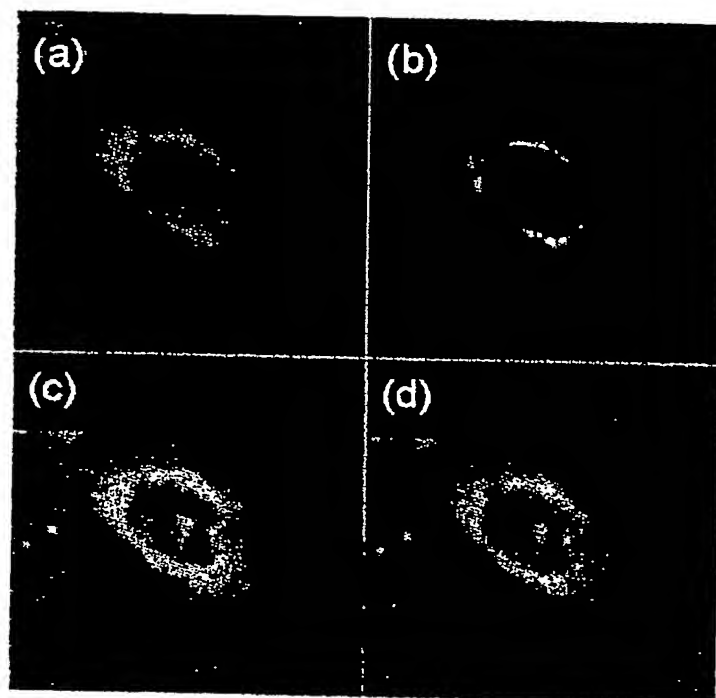
【図 2】



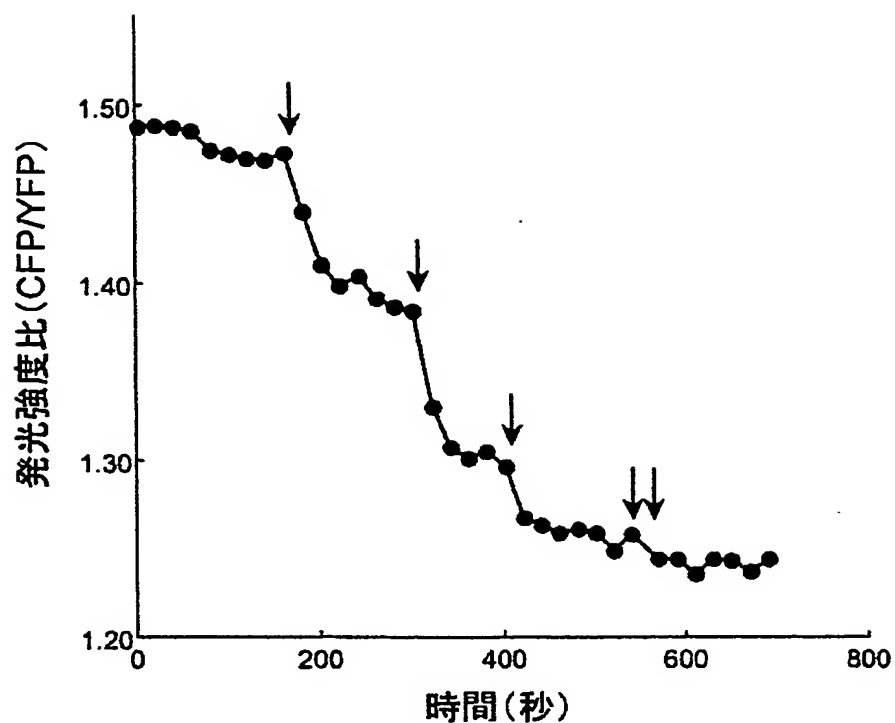
【図 3】



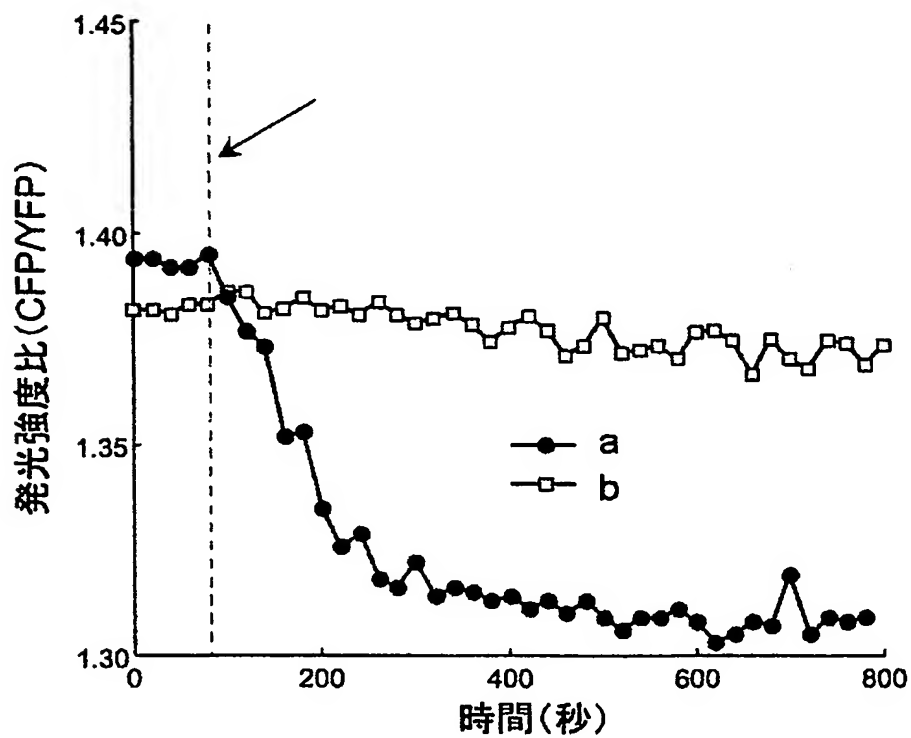
【図 4】



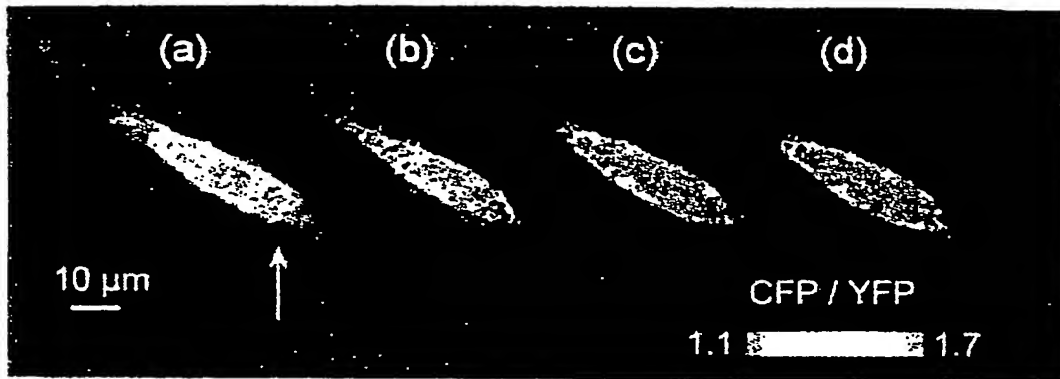
【図 5】



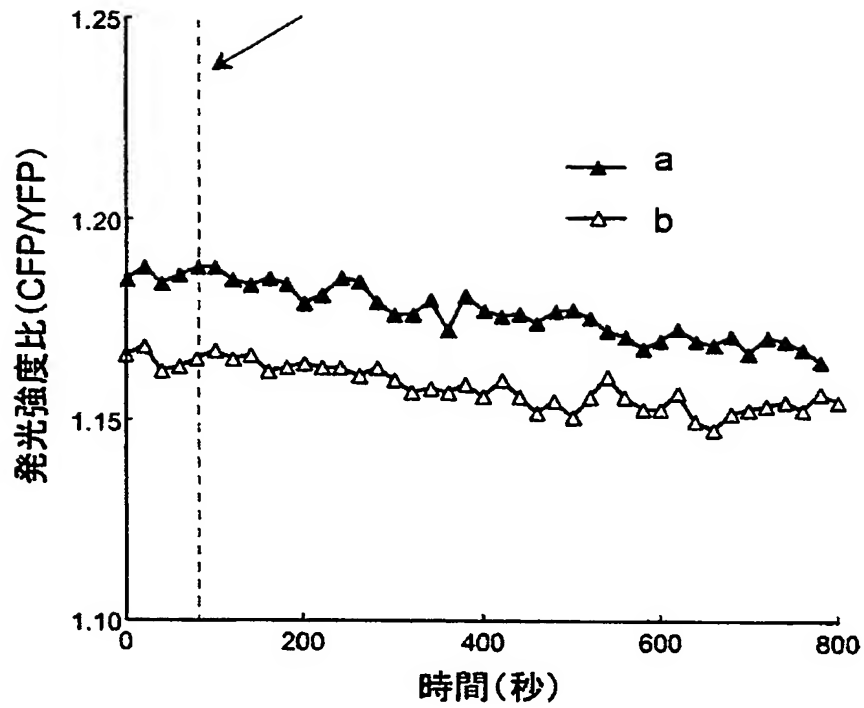
【図 6】



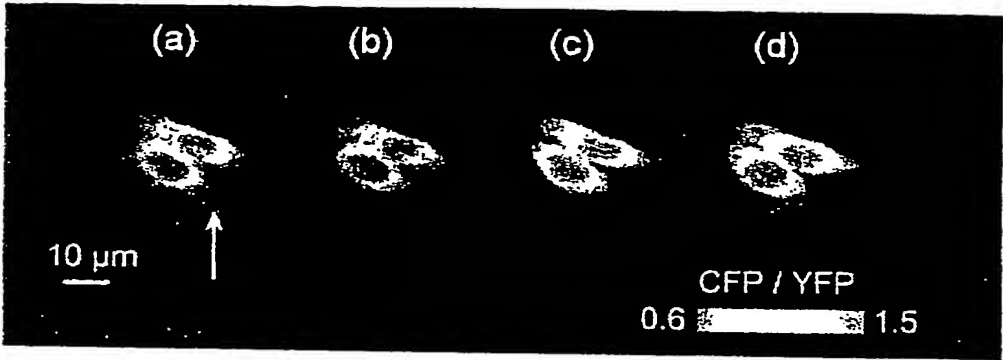
【図 7】



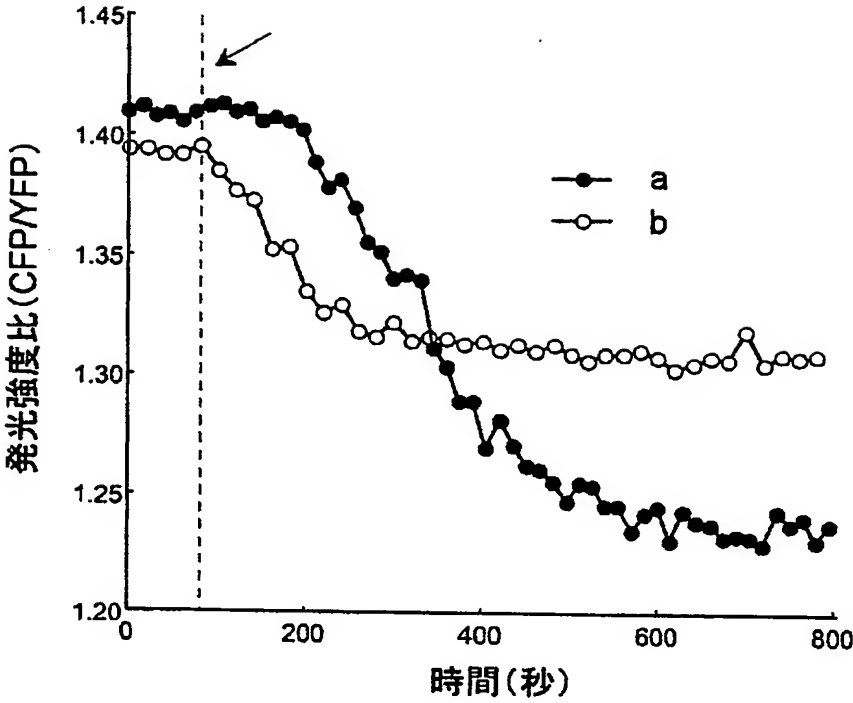
【図 8】



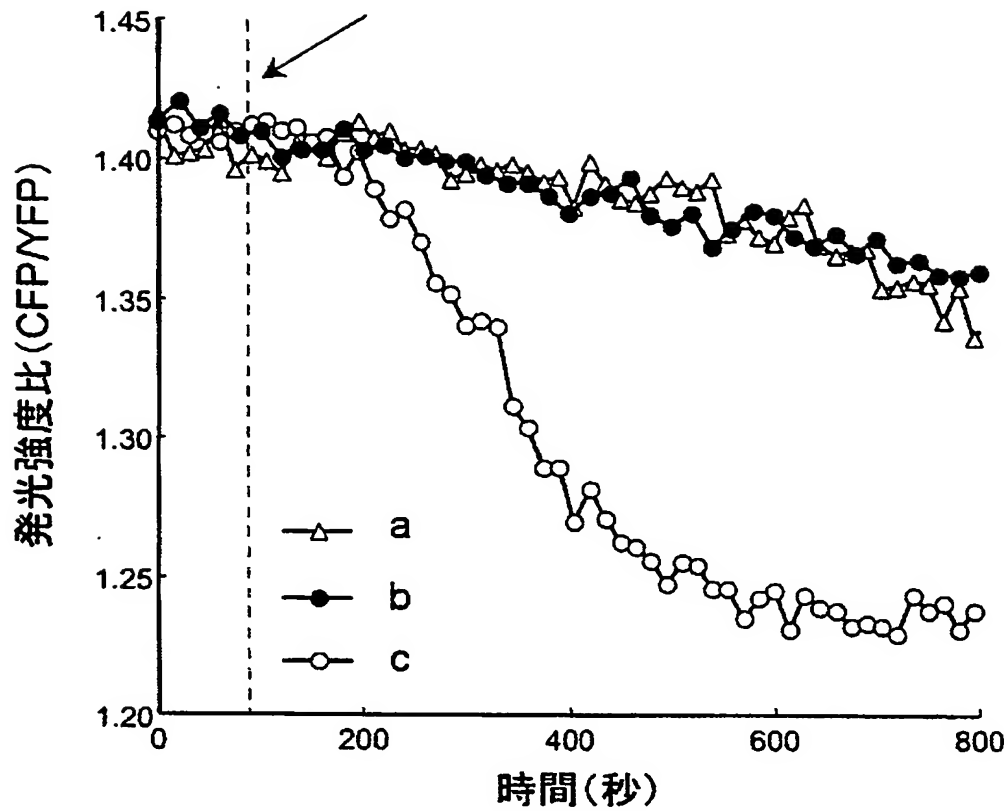
【図 9】



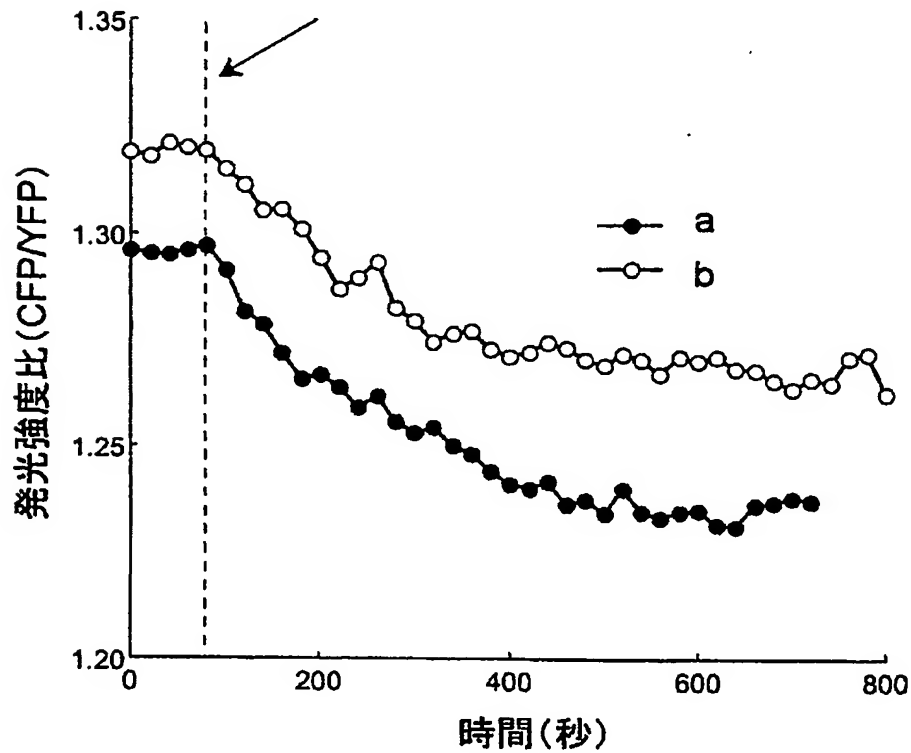
【図 10】



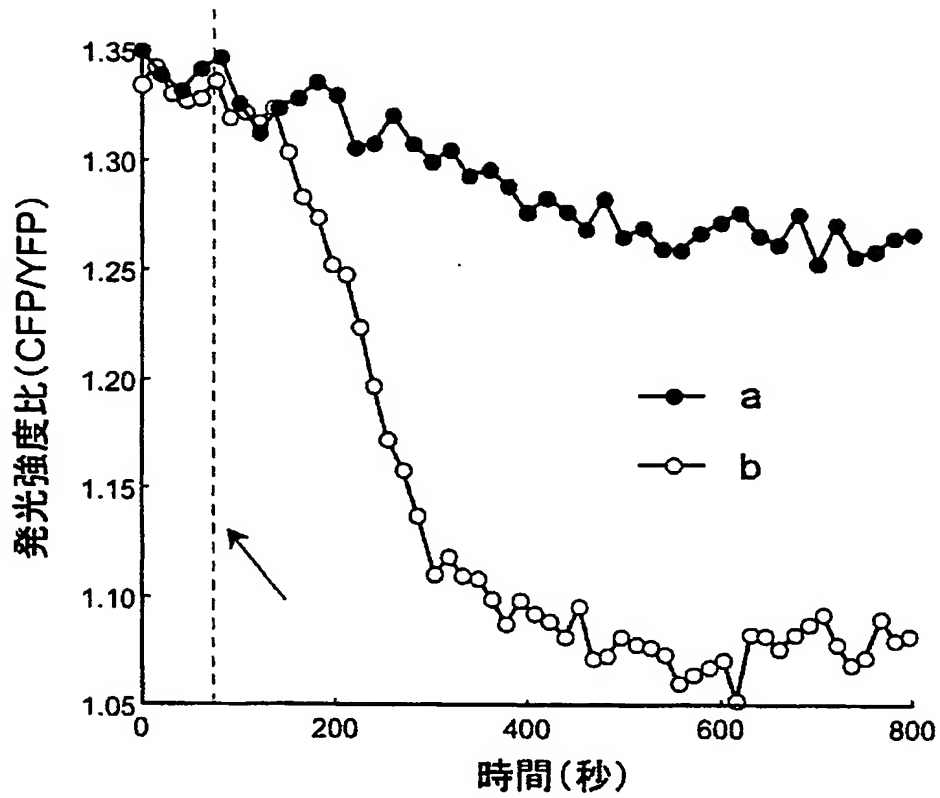
【図 1 1】



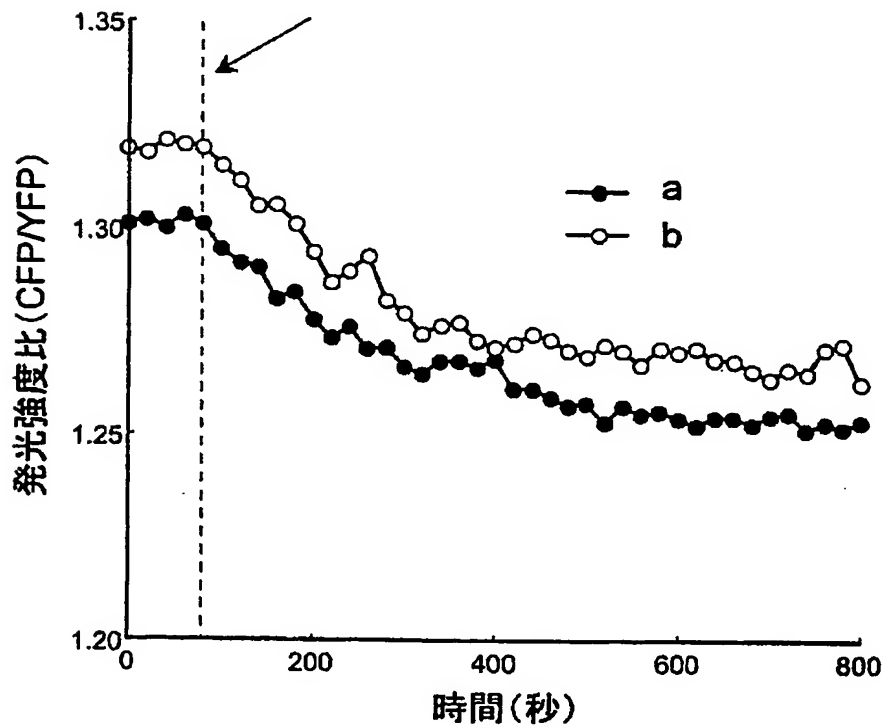
【図 1 2】




【図 13】



【図 14】






【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 脂質セカンドメッセンジャーが生細胞内のどの部位で、いつ、產生されたかを定量的に検出するためのプローブを提供する。

【解決手段】 脂質セカンドメッセンジャーに特異的に結合するポリペプチドと、該ポリペプチドの両末端に、剛直なリンカー配列を介して連結された異なる蛍光波長を有する二つの発色団と、一方の発色団と剛直なリンカー配列を介して連結された膜局在化配列を有することを特徴とする脂質セカンドメッセンジャー検出・定量用プローブとする。

【選択図】 図 1



【書類名】 出願人名義変更届 (一般承継)
【提出日】 平成15年10月31日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2003-120253
【承継人】
【識別番号】 503360115
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構
【代表者】 沖村 憲樹
【連絡先】 〒102-8666 東京都千代田区四番町5-3 独立行政法人科学技術振興機構 知的財産戦略室 佐々木吉正 TEL 03-5214-8486 FAX 03-5214-8417

【提出物件の目録】
【物件名】 権利の承継を証明する書面 1
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。
【物件名】 登記簿謄本 1
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。



特願 2003-120253

出願人履歴情報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

科学技術振興事業団



特願 2003-120253

出願人履歴情報

識別番号

[503360115]

1. 変更年月日

2003年10月 1日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

独立行政法人 科学技術振興機構